

MODIFIED IGM IMMUNOLOGICAL MEASURING REAGENT

Publication number: JP9127112

Publication date: 1997-05-16

Inventor: YOSHIMURA TORU

Applicant: DAINABOT CO LTD

Classification:

- international: G01N33/531; G01N33/576; G01N33/576; G01N33/531;
G01N33/576; G01N33/576; (IPC1-7): G01N33/576;
G01N33/531

- European:

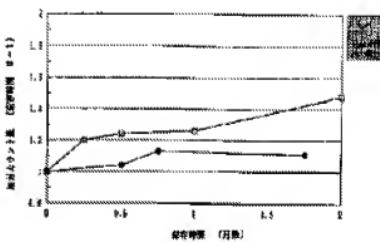
Application number: JP19950303302 19951030

Priority number(s): JP19950303302 19951030

[Report a data error here](#)

Abstract of JP9127112

PROBLEM TO BE SOLVED: To generate an immunoassay reagent stable and effective for a long period by reducing IgM-containing aqueous solution, then processing it with a modifying agent reactable to the free sulphydryl group to obtain the IgM reagent. **SOLUTION:** IgM is reduced with a reducing agent, e.g., cystine or glutathione, it is processed with a modifying agent such as acetic halide or its derivative to prevent the free sulphydryl group of the reduced IgM from forming S-S linkage, and the free sulphydryl group is aminoethylated, S-methylated, or iodoacetylated. A liquid containing the modified IgM is coarsely refined by the salting-out process, dialysis, and filtration, then it refined by gel filtration chromatography, and an effective IgM reagent used for normal immunological measurement is obtained. This modified IgM or modified IgM-containing aqueous solution is excellent in preservation stability, and it can be simply used. A type-A hepatitis patient can be surely diagnosed and detected.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(51) Int.Cl.⁶
G 0 1 N 33/531
// G 0 1 N 33/576

識別記号

府内整理番号

P I
G 0 1 N 33/531
33/576

技術表示箇所
A
A

審査請求 未請求 請求項の数15 FD (全 12 頁)

(21)出願番号 特願平7-303302
(22)出願日 平成7年(1995)10月30日

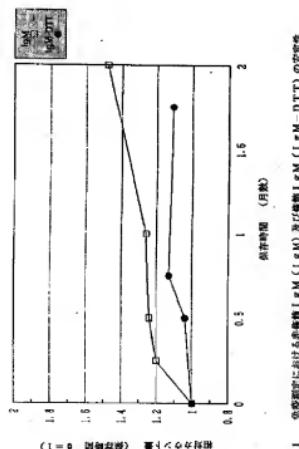
(71)出願人 000109015
ダイナポット株式会社
東京都港区六本木1-9-9 六本木ファーストビル
(72)発明者 吉村 梶
千葉県松戸市稔台344番地 ダイナポット
株式会社総合研究所内
(74)代理人 弁理士 水野 昭宣

(54)【発明の名称】 修飾IgM免疫学的測定試薬

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 免疫学的測定の試薬としてIgM自身を利用する場合、そのIgMが不安定であるという問題がある。こうした問題のない長い期間安定であり免疫測定試薬として有用なIgMを得る。特にHAV関連抗体を検出したたりする場合、被検試料の必要な測定範囲を簡単に設定できかつ特異的なIgM抗体を検出する時、前希釈の希釈倍率を低減せしめてより広範囲の測定を可能にする自動化に有利な安定化されたIgM試薬を得る。

【解決手段】 免疫学的測定法において使用するためのIgM試薬において、IgMまたはIgM含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルホヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液を該IgM試薬として用いる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 免疫学的測定法において使用するための I g M 試薬において、I g M または I g M 含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾 I g M または修飾 I g M 含有水溶液を該 I g M 試薬として用いることを特徴とする免疫学的測定試薬。

【請求項 2】 I g M または I g M 含有水溶液の還元処理が、システィン、ジチオスレイトール、及びグルタチオンから成る群から選ばれた還元剤で行われる請求項 1 記載の免疫学的測定試薬。

【請求項 3】 遊離スルヒドリル基と反応可能な修飾剤が、アミノアルキル化剤、S-アルキル化剤、ハロゲノアセチル化剤から成る群から選ばれたものである請求項 1 記載の免疫学的測定試薬。

【請求項 4】 遊離スルヒドリル基と反応可能な修飾剤が、ハロゲン化酢酸又はその誘導体、N-エチルマレインミド又はその誘導体、アリールジオ化合物、アリールフェニルハライド、水銀誘導体化合物、スルホネート化合物、O-メチルイソ尿素、チオン酸又はその誘導体塩、2-ヒドロキシエチルジスルフィドから成る群から選ばれたものである請求項 1 記載の免疫学的測定試薬。

【請求項 5】 遊離スルヒドリル基と反応可能な修飾剤が、ヨード酢酸、ヨード酢酸アミド、プロモ酢酸、プロモ酢酸アミド、クロロ酢酸、クロロ酢酸アミド、2-プロモブロピオン酸、N-エチルマレイド、5, 5'-ジジオビス(2-ニトロ安息香酸)、2, 2'-ジジオビスピリジン、4, 4'-ジジオビスピリジン、6, 6'-ジジオビスニコチン酸、2-ニトロスルフェニルクロリド、p-クロロマーキュリ安息香酸、p-ヒドロキシマーキュリ安息香酸、フェニル酢酸水銀、メチルp-ニトロベンゼンズルホネート、メチルメタシオヌスルホネート、O-メチルイソ尿素、テトラチオニ酸カリウム、テトラチオニ酸ナトリウム、及び2-ヒドロキシエチルジスルフィドから成る群から選ばれたものである請求項 1 記載の免疫学的測定試薬。

【請求項 6】 I g M 試薬が標識剤で標識化されている修飾 I g M または修飾 I g M 含有水溶液であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか一記載の免疫学的測定試薬。

【請求項 7】 標識が、放射性同位体、酵素、発光性物質、螢光性物質、及びビオチンから成る群から選ばれたものであることを特徴とする請求項 6 記載の免疫学的測定試薬。

【請求項 8】 標識化されている I g M 試薬がサンドイッチ・アッセイ法による抗原測定系に使用するものであることを特徴とする請求項 6 又は 7 記載の免疫学的測定試薬。

【請求項 9】 抗ヒト I g M 抗体試薬を使用して被検試料中の対象抗原に対する特異的 I g M 抗体を免疫学的に

測定する方法において、少なくともヒト I g M またはヒト I g M 含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾ヒト I g M または修飾ヒト I g M 含有水溶液からなる試薬により、被検試料を希釈することを特徴とする特異的 I g M 抗体測定方法。

【請求項 10】 特異的 I g M 抗体が HAV に対する I g M 抗体又は HBc に対する I g M 抗体である請求項 9 記載の特異的 I g M 抗体の測定法。

【請求項 11】 (1) 測定対象試料を必要に応じ緩衝剤、希釈液又は希釈剤の水溶液で希釈し、つぎに I g M または I g M 含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾 I g M または修飾 I g M 含有水溶液からなる試薬により、試料を希釈した後、試料中の測定対象特異的 I g M 抗体を、抗ヒト I g M 抗体結合固相担体と反応させて試料中の I g M 抗体を固相抗ヒト I g M 抗体と免疫学的に反応させ、

(2) (a) 得られた反応生成物に特定の抗原試薬を免疫学的に反応させ、さらに抗原試薬に対する抗体を標識剤で標識した標識抗体を免疫学的に反応させるか、又は

(b) 得られた反応生成物に特定の抗原試薬を標識剤で標識した標識抗原来免疫学的に反応させることを特徴とする請求項 9 又は 10 記載の特異的 I g M 抗体の測定法。

【請求項 12】 対象抗原を含有する被検試料に第 1 の抗体と第 2 の抗体を接触させることにより前記対象抗原と前記第 1 の抗体と前記第 2 の抗体とからなる複合体を形成させる工程を含む免疫学的測定方法において、前記第 1 の抗体と前記第 2 の抗体のいずれか一方が、少なくとも I g M を還元処理し、ついで遊離スルヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾 I g M でありかつ当該 I g M が標識剤で標識化されたものであることを特徴とする方法。

【請求項 13】 前記被検試料を、当該被検試料中の対象抗原に対する固相担体に結合されている第 1 抗体(固相化抗体)及び標識されている第 2 抗体(標識抗体)と接触させ、当該第 1 抗体と当該抗原と当該第 2 抗体との複合体を形成させ、当該複合体における標識抗体又は未反応標識抗体のいずれかを測定することを特徴とする請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】 (1) (a) 対象抗原を含有する被検試料に固相担体に結合されている第 1 抗体を接触させることにより前記対象抗原を前記第 1 の固相化抗体に結合させ、必要に応じ固相を洗浄処理した後標識され且つ還元処理された修飾 I g M である第 2 抗体を接触させることにより免疫複合体を形成させかかる、あるいは(b) 対象抗原を含有する被検試料に標識され且つ還元処理された修飾 I g M である第 2 抗体を接触させることにより前記対象抗原を前記第 2 の標識抗体に結合させ、次に固相

担体に結合されている第1抗体を接触させることにより免疫複合体を形成させ、(i i) 必要に応じ固相を洗浄処理して、当該複合体における標識抗体又は未反応標識抗体のいずれかを測定することを特徴とする請求項12又は13記載の方法。

【請求項15】 测定対象試料が、全血、血清、または血漿である請求項9～14のいずれか一記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、免疫学的測定試薬として有用な修飾IgMを提供する。特に、IgMまたはIgM含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液は、抗ヒトIgM抗体試薬を使用して被検試料中の対象抗原に対する特異的IgM抗体、例えばA型肝炎ウイルス(Hepatitis A virus: HAV)感染の診断などにおける免疫学的に測定する方法において、試薬として有用である。また標識剤で標識化された当該還元処理を受けている修飾IgM試薬は、いわゆるサンドイッチ・アッセイ法による抗原測定系の標識抗体として有用である。

【0002】

【従来技術及び発明が解決しようとする課題】 免疫学的測定法は、人の臨床における検査や病気の診断に広く利用される他、動物についてもその臨床検査や病気の診断、さらにはその他の広い範囲の測定対象物の分析、測定、定量、検出などの分野において応用されている。この免疫学的測定法は、抗原とその抗原に対する抗体との間の抗原抗体反応を利用するものである。免疫グロブリン、すなわち抗体は、IgM、IgG、IgA、IgD及びIgEといったアイソタイプクラスに分類できることが知られており、そのうちIgGはさらにIgG₁、IgG₂、IgG₃及びIgG₄といったサブクラスに分類される。免疫グロブリンのうちIgMは最も大きな分子量を有し、約9000,000というIgGに比べて、5倍以上の大きさで、一般的にはIgGのペンタマーに相当すると考えられている。つまりIgMは一般に10個の重鎖と10個の軽鎖と1本のJ鎖とからなり、抗体結合部位が10個で、さらにグルコサミンオリゴ糖の結合した糖タンパク質である。IgMは免疫応答において最も初期に生成されてくる抗体と考えられている。ペンタマーであるIgMは、抗原と結合したときIgGクラス抗体よりも効率よく動物の補体系を刺激することから、赤血球凝集反応、溶血反応、溶菌反応、中和反応、抗原との凝集反応などを起こすことが知られている。

【0003】 このIgMは、多糖類に対する特異性が高いことから、最近では癌関連抗原糖鎖に特異的な抗体として、癌診断に利用することが試みられている。こうしたIgMは、例えば酵素標識、酵素免疫測定法に応用しようとする標識IgM抗体が非常に大きな重合体と

なり、測定時の非特異的吸着などが高くなり、測定の再現性に問題があつたり、感度も低下することが知られている。一方上記したようにIgMは非常に低濃度でも細菌抗原やウイルス抗原などと反応するというようなその大きな抗体価を利用して、免疫測定試薬として利用することが図られている。特に急性期において生体内の免疫反応によりに生じる特異的IgM抗体を測定することは、例えば、ウイルス感染、病原菌感染などの初期感染の診断に用いられて有用であることから注目されている。このIgM測定を利用する免疫学的測定法の代表的なものとしては、IgM抗体捕捉測定法が挙げられ、例えば、A型肝炎ウイルス感染の診断、B型肝炎ウイルスコア抗原(Hepatitis B virus core antigen: HBc)、風疹、麻疹、ムンプスなどの診断などに利用されている。

【0004】 このIgM測定を利用する免疫学的測定法においては、通常抗ヒトIgM抗体試薬を使用して被検試料中の対象抗原に対する特異的IgM抗体を免疫学的に測定することが行われているが、この時被検試料を少なくともIgMまたはIgM含有水溶液により希釈することにより、被検試料の必要な測定範囲を簡単に設定でき、より早い時期で特異的なIgM、例えば、HAV関連抗体を検出したり、前希釈の希釈倍率を減低せしめてより広範囲の測定を可能にする自動化された測定系に適した測定方法が見出されている。しかしながら、試薬としてIgM自体を利用する場合、そのIgMが不安定であるという問題があつた。また、IgMは多価抗体であることから、非常に低濃度でも細菌やウイルスといった抗原や赤血球と反応し、凝集を起こす働きがあることが観察されている。また、IgMはIgGなどと比較して巨大な分子であるためか、凝集する傾向があり、一般に精製された形態で安定化することは比較的困難とされている。

【0005】 特にIgM自体を試薬として用い、例えば検体試料の希釈を行うと、IgMは希薄溶液で不安定で、希薄溶液として使用しようとすると極めて容易に凝聚して、測定に悪影響を与えるという問題があつた。このようにIgMは一般的に非常に不安定で、様々な物理的あるいは化学的ストレスによって容易に凝聚沈殿してしまい、試薬として使用するのに問題であった。こうした不安定なIgMは、濃縮溶液あるいは乾燥粉末として保存し、使用直前に希釈せざるを得ないが、これでは測定の度毎に特定濃度のIgM希釈液を調整する必要があるなど、さらに長期間の保存が困難などの問題があつた。また、免疫学的測定試薬としては、安価かつ大量に安定して供給されることも重要である。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記した問題のない希釈溶液としても長い期間安定であり、免疫測定試薬として有用な、特にHAV関連抗体を検出したり

する場合、被検試料の必要な測定範囲を簡単に設定できかつ特異的な IgM 抗体を検出する時前希釈の希釈倍率を低減せしめてより広範囲の測定を可能にする自動化された測定系に適した IgM を得るべく、観察研究を行った結果、簡単な方法によりそれらの問題を解決しうることを見出し、本発明を完成了。

【0007】本発明は、免疫学的測定法において使用するための IgM 試薬において、IgM または IgM 含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾 IgM または修飾 IgM 含有水溶液を該 IgM 試薬として用いることを特徴とする免疫学的測定試薬を提供するものである。またより具体的な態様では、本発明は抗ヒト IgM 抗体試薬を使用して、被検試料中の対象抗原に対する特異的 IgM 抗体を免疫学的に測定する方法において、被検試料を少なくとも IgM または IgM 含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾 IgM または修飾 IgM 含有水溶液からなる試薬により希釈することを特徴とする特異的 IgM 抗体測定試薬及びその試薬を用いた測定方法を提供する。

【0008】本発明は、さらに被検試料中の抗原を免疫学的に測定する方法において使用するための IgM 試薬において、IgM 抗体試薬を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた IgM 抗体であり且つ当該 IgM 抗体は標識剤で標識化して得られた標識 IgM 抗体であることを特徴とする免疫学的測定試薬及びその試薬を用いた測定方法を提供する。より具体的な態様では、対象抗原を含有する被検試料に第1の抗体と第2の抗体を接触させることにより前記対象抗原と前記第1の抗体と前記第2の抗体とからなる複合体を形成させる工程を含む免疫学的測定方法において、前記第1の抗体と前記第2の抗体のいずれか一方が、IgM または IgM 含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾 IgM または修飾 IgM 含有水溶液でありかつ当該 IgM が標識剤で標識化されたものであることを特徴とする方法が提供される。好ましくは標識 IgM 抗体試薬は、サンドイッチ・アッセイ法による抗原測定系に使用することができる。

【0009】

【発明の実施の形態】 IgM を含む試薬溶液としては、特に限定されないが、動物の血清、例えばヒト血清、ハイブリドーマを移植した動物の腹水液、ハイブリドーマ及びリンパ球の培養液、遺伝子工学的に IgM 様抗体を分泌せしめられた培養液、あるいは精製された IgM などが挙げられる。また IgM の由来としては特に限定されないが、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシなどの動物が挙げられ、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、それら

の混合物などを用いることが出来る。

【0010】こうした IgM を還元する試薬としては、例えばジスルフィド結合を温湿な条件で部分的に開裂し遊離スルフヒドリル基を形成せしめる還元剤が挙げられる。例えばシステイン、ジチオスレートール、グルタチオンなどが挙げられる。以上のような還元剤を用いて IgM を還元して部分的にジスルフィド結合を開裂するにあたっては、特に限定されないが、例えば反応時間を短く設定したり、反応時の pH を調整して徐々の温湿な還元となるようにして、反応時の温度を低くしたり、試薬濃度を低くしたりして温湿な条件とすることにより、分子量が IgM の 1/5 の均一なサブユニットに解離し、その際 IgM 1 分子あたり 10 個の HS- 基の遊離がみられる。こうして還元された IgM を含む液は、必要に応じ IgM 精製処理に付されることができるし、そのまま次の処理に付することもできる。好ましくは、還元処理の前に IgM を精製工程に付したものを使用することが好ましい。例えば IgM を含む液は塩析工程、透析、濾過などの粗精製を行い、次にゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどを用いて精製することが出来る。

【0011】こうして得られた還元された IgM は、次にその遊離スルフヒドリル基が S-S 化合物を形成するのを防止するため修飾剤で処理される。遊離スルフヒドリル基の修飾剤としては、実質的に IgM としての利用上の問題がなければ特に限定されないが、例えばヨード酢酸、ヨード酢酸アミド、プロモ酢酸、プロモ酢酸アミド、クロロ酢酸、クロロ酢酸アミド、2-ブロモプロピオン酸などのハロゲン化酢酸又はその誘導体、N-エチルマレイミド又はその誘導体、5, 5'-ジチオビップ(2-ニトロ安息香酸)、2, 2'-ジチオビスピリジン、4, 4'-ジチオビスピリジン、6, 6'-ジチオビスピニコチン酸などのアリールジチオ化合物、2-ニトロスルフェニルクロリドなどのアリールフェニルクロリド、p-クロロマーキュリ安息香酸、p-ヒドロキシマーキュリ安息香酸、フェニル酢酸水銀などの水銀誘導体化合物、メチル p-ニトロベンゼンスルホネート、メチルメタンチオスルホネートなどのスルホネート化合物、O-メチルイソ尿素、テトラチオノン酸カリウム、テトラチオノン酸ナトリウムなどのチオノン酸塩、2-ヒドロキシエチルジスルフィドなどが挙げられる。還元された IgM に存在する遊離スルフヒドリル基を、アミノエチル化、S-メチル化、ヨードアセチル化することは、好ましい。

【0012】こうして修飾された IgM を含む液は、必要に応じ修飾 IgM 精製処理に付されることができるし、そのまま使用に付することもできる。例えば修飾された IgM を含む液は塩析工程、透析、濾過などの粗精製

を行い、次にゲル滲過クロマトグラフィーなどを用いて精製することが有効である。こうして得られた修飾 Ig Mは、さらに必要に応じ標識を施すこともできる。例えば放射性ヨウ素などの放射性同位体などで標識することもでき、ペルオキシダーゼ、アルカリフェヌルファーティーゼ、ガラクトシダーゼなどの酵素、アクリジウム塩、フルオレッセインなどの発光あるいは螢光標識など、ビオチンなどで標識することもできる。こうして得られた修飾 Ig Mは、さらに通常の免疫学的測定法に用いることが出来る。免疫学的測定法としては、使用する標識、測定手法などに従い種々の方法が知られ、例えば放射免疫測定法、酵素免疫測定法、螢光免疫測定法、化学発光免疫測定法、凝集免疫測定法、サンドイッチ法、競合法などが挙げられる。さらにこの還元処理されると共に標識剤で標識化された標識 Ig M試薬は、好ましくはサンドイッチ・アッセイ法による抗原測定系に使用することができる。

【0013】より具体的な態様においては、本発明は、試料を一旦緩衝剤、希釈液又は希釈剤などの水溶液で幾分か希釈し、つぎに試料を少なくとも修飾 Ig Mまたは修飾 Ig M含有水溶液により希釈した後、試料中の抗ウイルス特異的 Ig M抗体などの特定の抗原に特異性をもつ Ig M抗体を、抗ヒト Ig M抗体で被覆した固相担体などと反応させて試料中の Ig M抗体を固相抗ヒト Ig M抗体と免疫学的に反応させ、(a) つぎにウイルスなどの特定の抗原試薬を免疫学的に反応させ、得られた反応生成物に化学発光標識抗ウイルス抗体などの標識抗体を免疫学的に反応させるか、または(b) ウィルスなどの特定の抗原試薬を標識剤で標識した標識抗原を免疫学的に反応させることからなることを特徴とする特異的 Ig M抗体の測定法及びその測定法に用いる試薬が提供される。また別の具体的な態様においては、本発明は、対象抗原を含有する被検試料に第1の抗体と第2の抗体を接触させることにより前記対象抗原と前記第1の抗体と前記第2の抗体とからなる複合体を形成させる工程を含む免疫学的測定法において、前記第1の抗体と前記第2の抗体のいずれか一方が、少なくとも Ig Mまたは Ig M含有水溶液を還元処理し、ついで離心スルブヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾 Ig Mまたは修飾 Ig M含有水溶液でありかつ当該 Ig Mが標識剤で標識化されたものであることを特徴とする方法を提供する。より好ましくは該方法は、前記被検試料を当該被検試料中の対象抗原に対する固相担体に結合されている第1抗体（固相化抗体）及び標識されている第2抗体（標識且つ修飾 Ig M抗体）とに接触させ、当該固相化第1抗体と当該抗原と当該標識 Ig M第2抗体との複合体を形成させ、当該複合体を未反応標識抗体から分離した後、当該複合体における標識抗体又は未反応標識抗体のいずれかを測定することを特徴とするものである。被検試料中の対象抗原と各抗体との接触は、同時に当該

固相化第1抗体と当該標識且つ修飾 Ig M第2抗体とを該被検試料中の対象抗原に接触させるものであってもよいし、あるいは先ず該被検試料中の対象抗原と固相化第1抗体とを接触させ、必要に応じ、洗浄処理を加えた後、当該標識且つ修飾 Ig M第2抗体を接触させるものであってもよいし、さらには先ず該被検試料中の対象抗原と標識且つ修飾 Ig M第2抗体とを接触させ、次に当該固相化第1抗体を接触させるものであってもよい。典型的にはサンドイッチ法として広く知られた種々の手法を適用することができる。

【0014】特に好ましい測定系の例としては、HAV感染の急性期に生ずる、Ig M型の抗-HAV抗体を測定することによりA型肝炎の感染を診断する方法が挙げられる。この Ig M型の抗-HAV抗体を特異的に測定する系では、μ-鎖特異性の抗ヒト Ig M抗体で被覆した固相、例えば下記に示すような固相担体を、測定試料と反応させ、次に HAV抗原試薬と反応させ、最後に標識抗-HAV抗体と反応させるというように順次反応させることにより行われる。A型肝炎ウイルス（HAV）は、1973年フェインストン（Finstone）等によりA型肝炎急性期患者の便材料のうちに発見され、1977年には実験感染デンバージー肝組織における増殖の報告がされており、1979年には初代マーモセット肝細胞及びアカゲザル胎児腎細胞での増殖が報告されて以来、HAVを培養細胞系では初代及び株化アフリカミドリザル腎細胞、ヒト二倍体細胞などにおいて増殖せしめることが報告されている。HAVは糞便などによる経口感染をその主な伝播経路とするため、環境衛生の不備な地域での感染の危険は大きく、最近では海外渡航の機会も増加し、こうしてHAV感染の検査が、近親者間、従業員者間などでの感染を防ぐ意味でも重要視されている。

【0015】この急性期のHAV感染の検出のためには、HAV感染に伴って生体内の強い免疫反応により患者の血液中に出現する抗-HAV抗体、特にHAVに特異的な Ig M抗体を検出して行われており、この抗-HAV（Ig M）抗体と免疫学的に反応性を有するHAV抗原を試薬として用いる次のような Ig M抗体捕捉測定法が開発されている。代表的な Ig M抗体捕捉測定法にしたがう急性A型肝炎の感染診断法は、Ig M抗体のμ-鎖に特異性をもつ抗ヒト Ig M抗体を使用し、その抗ヒト Ig M抗体（μ-鎖特異抗体）で被覆した固相、例えば下記に示すような固相担体を、測定試料と反応させ、次に HAV抗原試薬と反応させ、最後に標識抗-HAV抗体と反応させるというように順次反応させることにより行われている。

【0016】ところが、このような急性期においては血液、血清、血漿などの被検試料中の抗-HAV（Ig M）抗体などの測定すべき特異的な Ig M及び总 Ig Mの濃度は様々である。一般には、血液中の總 Ig M量は通常

約0.4~2mg/ml存在していることが知られているが、上記した第一反応での抗ヒトIgM抗体で被覆した固相の抗体量が充分でない場合が起こるので、被検試料を前希釈、例えば、高倍率の前希釈を行うことが必要であるという問題がある。従来は、緩衝水溶液、生理食塩水溶液などで被検試料を前希釈していた。こうすると総IgM抗体の量を減ずることになるが、総IgM抗体量に対する特異的IgM量の比率を減することはできない。そのため、必要な測定範囲を得ることが困難であるという問題がある。また自動化された測定系においては、希釈液量が制限されるという問題があり、測定範囲が限定されてしまうという問題があった。これを解決する手段として、例えば試料をヒトIgM含有フラクション、精製ヒトIgMなどの水溶液を添加して、試料中のIgM量に影響されること無く、目的の抗原に特異的なIgM抗体を測定できるようとする。

【0017】被検試料をIgM含有溶液で希釈する場合、前もって生理食塩水などで被検試料を適宜希釈してもよい。さらにヒトIgM溶液の添加処理により、より広範囲の測定を達成することもできるし、測定試料調製の手間、例えば試料濃度の調製などの測定範囲設定が簡単に行なうことができるようになり、自動化免疫測定系における適用が容易になる。しかし、試薬としてより安定なIgMが好ましい。本発明では、修飾ヒトIgM含有フラクション、精製修飾ヒトIgMなどの水溶液を添加しても同様の利点が得られることを認識してなされている。こうして上記したように特異的なIgM、例えば、HAV連関抗体を検出したり、前希釈の希釈倍率を低減せしめてより広範囲の測定を可能にし、例えば、A型肝炎などの高濃度領域における確実な測定法が可能になる。また、還元処理したIgM抗体を標識抗体として抗原測定系に使用すれば、安価かつ大量の標識抗体を供給することが可能になる。

【0018】本発明に従ったIgM型の抗HAV抗体を特異的に測定する系で用いられるHAV抗原試薬は、イン・ビトロの細胞培養法で得られたウイルス抗原を用いている。それは感染細胞を溶菌化して得られた細胞ライゼートから分離されたHAV抽出物あるいはそれから誘導されたものが挙げられる。そのHAV抽出物は、例えばアフリカミドリザル骨髄細胞、ヒト肝臍腫瘍セルラインPLC/PRF/5、Hep G2などのHAV感染細胞であって培養したもので、さらに好ましくは大量にHAVを産生するセルライン細胞を、公知の生育培地、例えばイーグル最小必須培地(Eagle's MEM)、ダルベッコ最小必須培地(Dulbecco's MEM)、PRM1-1640(Gibco社)、Eagle's MEM、N-(2-ヒドロキシエチル)ビペラジン-N'-(2-エタンスルホ酸)(HEPES)緩衝液添加イーグルMEM、リン酸緩衝化L-15-a培地、ハンクス液(Hanks'

balanced salt solution)などの生育培地で、必要に応じウシ胎児血清(FCS)、ベニシリン、トレプトマイシンなどの抗生素質、酵母抽出液、バクトベントン、ラクトアルブミン加水分解物、その他細胞成長因子などを添加したものの中で培養し、次にこうして得られた細胞培養物から次のようにして得られる。

【0019】つまり、上記のようにして得られた細胞培養物から栄養培地を除去し、ついで細胞を生理的食塩水、燐酸塩などで緩衝化された溶液などで、必要に応じEDTAなどのキレート化剤を添加したもので洗浄する。こうして単離・収穫された細胞を、代表的にはEDTAなどのキレート化剤及びポリオキシエチレンエーテル(代表的なものは、0.5% Triton X-100などの商品名で入手しうる)などの非イオン界面活性剤を含む燐酸塩などで緩衝化された溶液、例えば1mMのEDTA及び0.5% Triton X-100を含む燐酸塩緩衝液、あるいはデオキシコール酸塩を含む燐酸塩などで緩衝化された溶液でもって溶菌処理し、こうして得られた細胞ライゼートを、必要に応じ、例えば約1~1.5分間インキュベーション処理し、つぎに遠心処理、例えば約1,000~2,000×g、好ましくは約2,000~10,000×gで、約5~60分間、好ましくは約10~30分間遠心処理し、HAV抽出物を得ることができる。このように、細胞ライゼートからその核由来物質、細胞オルガネラ、破壊物などを遠心分離処理して除き、HAV抽出物が得られている。HAV抽出物は、例えば米国特許明細書第4,721,675号に記載のようにも得られる。HAV抽出物は、必要に応じ、例えばクロロホルム抽出法、醇素処理法、蔗糖濃度勾配遠心分離法などでさらに精製することもできる。

【0020】こうして得られたHAV抽出物は、つぎに公知の方法又はそれを修飾した方法によりその感染性を不活性化するための処理がなされる。不活性化処理は、例えばホルマリン液で処理する、例えば約37℃で約2.5~4.5%ホルマリン溶液の約1:3000~1:7000希釈下、例えば、1:4000希釈下にインキュベーション処理することにより行なうことができるが、その他適切な方法を公知のものの中から選んで適用することが出来る。この処理は、例えば、2週間行なうともでき、さらにそれより短い時間あるいは長い時間でもよい。この処理の際の処理液においては、必要に応じ、緩衝剤、希釈液又は希釈剤、キレート化剤、保存剤などを添加して用いることができる。

【0021】緩衝剤、希釈液又は希釈剤としては、水、リン酸緩衝液、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)緩衝液、生理食塩水などの塩化ナトリウム液、N-(2-ヒドロキシエチル)ビペラジン-N'-(2-エタンスルホ酸)(HEPES)液、ビペラ

ジン-N, N'-ビペス(2-エタンスルホン酸)(P I BES)液、3-(シアノヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸(CAPS)液、3-(モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)液、アミノ酸液などが挙げられる。これらは単独でも、任意に組合せて配合しても用いることができる。キレート化剤としては、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、エチレングリコール-ビペス(β-アミノエチルエーテル)-N, N, N', N'-テトラ酢酸(EGTA)などが挙げられる。

【0022】本発明によれば、こうして得られた感染性が不活性化されたHAV抽出物は、それをそのままHAV抗原として用いることもできるし、さらにそれをつぎに界面活性剤で処理し得られたものも用いることができ、こうした界面活性剤処理HAV抽出物は好ましいものとして使用できる。界面活性剤としては、適切なものを公知又は市販のものうちから選んで用いることができ、特にアニオン性界面活性剤が適している。

【0023】アニオン性界面活性剤としては、ステアリン酸カリウムなどの炭素数1~2~18の高級脂肪酸のアルカリ金属塩、脂質酸のアルカリ金属塩、炭素数1~2~18の高級脂肪酸のトリエタノールアミンなどの有機堿基塩、ドデシル硫酸リチウム(LDS)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)などの炭素数1~2~18の高級脂肪酸又は高級アルコールの硫酸エチル、アルキルスルホン酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムなどのアルキルアリールスルホン酸塩などが挙げられ、特にLDS、SDSは著効を示す。アルカリ金属としては、ナトリウム、カリウム、リチウムなど、アルカリ土類金属としては、カルシウム、マグネシウムなどが挙げられる。これら界面活性剤は、共存する蛋白質の量に応じて、その使用量を選ぶことが好ましく、例えば約0.01%v/v~約1.0%v/vの範囲で用いることができる。特に好ましくはSDSを用い、約0.05%v/v~約5%v/v、より好ましくは共存する他の蛋白質が存在しない場合には約0.5%v/v~約1.0%v/vの範囲で用いることができる。

【0024】界面活性剤でHAV抽出物を処理するにあたっては、必要に応じHAV抽出物を緩衝剤、希釈液又は希釃剤などで希釃し、所要濃度を与える界面活性剤溶液と混合するか、懸濁する。こうして得られた混合物は、必要に応じ攪拌処理ができる。また場合によっては、混合物中にガラスピーズなどを加えて攪拌処理してもよい。攪拌処理は、測定感度を改善しうるものであれば、例えば穏やかな混合のみで済ますこともできるし、激しい攪拌混合であること也可以。処理温度は、室温で行うこともでき、冷却下に行うこともできるし、37℃あるいはそれ以上の温度とすることも測定感度を改善しうるものであれば、採用できる。界面活性

剤で処理されたHAV抽出物は、そのまま次の処理に使用できるし、あるいは一旦保存したのち次の処理に使用できるし、また必要に応じ遠心分離などの分離処理をし、さらに必要に応じ洗浄などの処理をして後、次の処理に使用できる。これらの処理は、測定時の非特異吸着を抑制し、感度を改善しうるように選ぶことができる。

【0025】本発明の界面活性剤処理の際の処理液においては、緩衝剤、希釃液又は希釃剤、キレート化剤、保存剤などを添加して用いることができる。緩衝剤、希釃液又は希釃剤としては、水、リン酸又はリン酸塩緩衝液、Tris緩衝液、例えば生理食塗水などの塩化ナトリウム液、HEPES液、PIBES液、CAPS液、MOPS液、N, N'-ビペス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)液、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES)液、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)液、アミノ酸液などが挙げられる。これらは単独でも、任意に組合せて配合して用いることができる。キレート化剤としては、EDTA、EGTAなどが挙げられる。

【0026】本発明によれば、HAV抽出物は、必要に応じて、その感度を不活性化する前に上記界面活性剤で処理し、つぎに得られた界面活性剤で処理されたHAVを、公知の方法又はそれを修飾した方法により不活性化処理してもよい。不活性化処理は、上記と同様にしてよく、例えば約37℃で約3.7%ホルマリン溶液の1:4000希釃液にインキュベーション処理することにより行うことができる。

【0027】より具体的な態様において、本発明で用いられるHAV抗原試薬は、イン・ビトロの細胞培養法で得られた細胞ライゼットから得られたHAV抽出物を約0.5%v/v~約1.0%v/vの範囲のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)液と混合し、つぎに必要に応じ、例えば室温で3時間インキュベーション処理し、SDS処理HAV抽出物を得ることによって提供されるものであることもできる。本発明では、少なくとも1gまたは1g含有水溶液処理工組合せ、その該当されたSDS処理HAV抽出物を用いた試料中のHAV抗体の免疫測定試薬及びそれを用いた試料中の抗体の測定法も提供される。また抗原、例えば、HBc抗原などは、ウイルス培養物から得ることもできるが、遺伝子組換えの手法を用い、大腸菌、酵母などで発現させた組換え抗原であることもできる。

【0028】本発明において試料中の特異的IgM抗体を測定するにあたっては、抗IgM抗体を、必要に応じて、例えば、寒天、アガロース、架橋アガロース、架橋アルギン酸、セルロース、ニトロセルロースやカルボキシセルロースなどのセルロースエチルあるいは混合セルロースエチル、紙、デキストラン、ゼラチン、架橋ゼラチン、キチン、コラーゲン、綿などの生体由来高

分子あるいは天然物由來高分子、ポリスチレン、ステレノーブタジエン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ステレン-メタクリレート共重合体、ポリグリジルメタクリレート、アクリロイーン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミドなどのアクリル樹脂、イオン交換樹脂、光架橋樹脂、ポリエスチル、ポリアミド、ポリウレタン、ポリアセタールなどの合成高分子・樹脂などの天然あるいは合成の修飾あるいは非修飾の重合炭水化物、重合炭水素など、それらの架橋誘導体など、ガラス、例えば活性化ガラスなど、シリカゲル、アルミニウム、シリカアルミニウム、硫酸バリウム、セラミック、カーボン、硫酸マグネシウムなどの無機質材料などからなる微粒子、ビーズ、マイクロプレート、マイクロタイマー、ウェル、マイクロチューブ、ストリップ、メンブレン、トレイン、ゲルなど、さらには赤血球、ゴム、ラテックス粒子、乳剤などの固相に固定しておき、この固相を、分析対象としての特異的IgM抗体を含有する試料と接触させ、こうして固相化された抗IgM抗体と、分析試料中の特異的IgM抗体とを免疫学的に反応せしめ、この固相に結合した特異的IgM抗体を検知することにより行なうことができる。さらにまた、上記固相はサンドイッチ法に用いられる固相として用いることができる。そして固相には抗原、抗体など免疫学的反応に関与する様々な分子種や物質を固定化することができる。通常サンドイッチ法で良く知られたものが特に制限無く用いることができる。好みの状態において、本発明では試料と反応せしめられる抗ヒトIgM抗体結合固相としては、ポリスチレン製のビーズ、ポリスチレン製の微小粒子などを用いることができる。

【0029】また、抗体としては、ヒトIgMに対する抗体であれば特に限定されることなく用いることができる。抗体は常法により得ることができ、例えば村松繁、他編、実験生物学講座1、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、統生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学II、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて、例えばウマ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、ラット、マウスなどを免疫するなどして得たり、モノクローナル抗体であることもでき、これらは単独でもあるいはこれらを組合せて用いることは任意にできる。これら抗体は、必要なら、ペプシン、ババインなどの酵素で消化して、F(ab')₂、F(ab)として使用してもよい。抗ヒトIgM抗体としては、好ましくはμ鎖に対して特異的に反応する抗体、抗μ鎖抗体が挙げられ、これらはマウスキモーマ細胞を用いて細胞融合技術を利用して得られたモノクローナル抗体であってもよいことはいうまでもない。また、抗原を測定する際

に用いる標識IgM抗体は、モノクローナル抗体であつてもよいことはいうまでもない。

【0030】ラジオイムノアッセイ、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法などでは、¹²⁵I、³Hなどの放射性物質、西洋わさびペルオキシダーゼ、β-D-ガラクトシダーゼ、アルカリフィオスターゼなどの酵素、フルオレッセインなどの螢光色素、アクリジニウムエステル類などの化学発光色素、金コロイド、セレニウムコロイドあるいは有色ラテックス粒子などの有色物質などで標識された抗原あるいは抗体が試薬として用いられ、分析試料中の抗体あるいは抗原と直接または間接的に結合反応せしめられ、その放射活性、酵素活性、化学発光あるいは色の有無などを測定して、試料中の抗体等が存在していたか否かを判別することができる。本発明においては、特に化学発光標識法、例えばアクリジニウムエステル類あるいは螢光標識法、例えばオレッセンスなどで標識された抗体試薬を用いる螢光あるいは化学発光免疫測定法は自動化された測定ができる好ましい方法である。特にアクリジニウムエステル類で標識された抗体試薬を用いる化学発光免疫測定法は自動化された測定ができる好ましい。

【0031】アクリジニウムエステル類としては、例えば特開昭62-39598号公報、特開昭62-61969号公報、特開昭63-57572号公報、特開昭63-101368号公報、特開昭63-112564号公報、特開平1-199949号公報、特開平1-261461号公報、特開平2-96567号公報、特開平2-133469号公報、特開平2-503268号公報、特開平2-501772号公報、欧州特許公開出願第0082636号、英国特許明細書第1,461,877号、米国特許明細書第3,539,574号などに記載のN-アルキル又はアリールアクリジニウム-9-カルボン酸エステルなどが挙げられる。

【0032】特に、特開昭63-112564号公報、米国特許明細書第3,539,574号などに記載の1-N-アルキル・N-アルキル又はアリールスルホニルアルキジニウム-9-N-アルキル又はアリールスルホニルアルキジニウム-9-カルボキサミド、N-メチルアルキジニウム-9-カルボン酸エステルなどは代表的な化学発光標識として挙げられる。アクリジニウム標識の場合、測定前に発色試薬処理、例えば過酸化水素水溶液、及び水酸化ナトリウム、例えば約0.05N～約0.5Nの水酸化ナトリウム水溶液で処理してから、ルミノメーターなどを用いて測定を行うことができる。勿論、標識剤は上記のものに限定されることなく、測定に使用される機器、場所などを考慮し、適宜当該分野で使用することが知られているものの中から目的に応じ選択して用いることができる。

【0033】固相あるいは標識などと抗原あるいは抗体などを結合あるいは吸着させるには、当該分野で汎用

されている方法を用いることができる。例えばイオン相互作用、疎水相互作用、共有結合などの物理的吸着や化学的結合により行うことができる。例えば、架橋剤としては、グルタルアルデヒド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピロ)カルボジイミド、N,N'-オーフェニレンジマレイミド、N-スクリンシイミジル-3-(2-ビリジルジチオ)プロピオネート、N-スクリンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテート、N-スクリンシイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクリンシイミジル

6-マレイミドヘキサエート、N-スクリンシイミジル-4-ヨードアセチルアミノベンゾエート、N-スクリンシイミジル-3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオネート、N-スクリンシイミジル-m-マレイミドベンゾエート、N-スクリンシイミジル-4-マレイミドブチレート、N-スクリンシイミジル-(p-マレイミドフェニル)アセテート、N-スクリンシイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレートなどが挙げられる。

【0034】本発明の測定系においては、界面活性剤、緩衝剤、希釈液又は希釈剤、ブロッキング剤、キレート化剤、保存剤などを含有させるようにして用いることができる。界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタン(代表的なものは、Tween 20などの商品名で入手しうる)、ポリオキシエチレンエーテル(代表的なものは、Triton X-100などの商品名で入手しうる)、オクチルフェノール・エチレンオキサイド縮合物(代表的なものは、Nonidet P-40などの商品名で入手しうる)などが挙げられる。

【0035】緩衝剤、希釈液又は希釈剤としては、上記したような水、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、生理食塩水など、HEPES液、PBES液、CAPS液、MOPS液、アミノ酸液などが挙げられる。これらは単独でも、任意に配合しても用いることができる。キレート化剤としては、EDTA、EGTAなどが挙げられる。

【0036】保存剤としては、例えばナトリウムアジド、エチルパラベンなどが挙げられる。その他、本発明の測定系には、各種動物の血清、例えばウシ血清、ウシ血清アルブミン(BSA)、ウシ胎児血清(FCS)、ヤギ血清、卵白アルブミン、ゼラチン、各種乳蛋白質、例えばスキムミルク、カゼイン、カゼイン分解物、ホエー蛋白質など、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどからなる群から選ばれたものを添加することができる。

【0037】本発明においては、試薬は單一の容器あるいは複数の容器に入れてあり、使用にあたり配合されて用いるようになっていてもよい。IgM抗体測定の代表的なHAV感染診断のための測定系のより具体的な態様においては、本発明は、試料を適当な濃度に生理食塩水などで希釈し、例え約80~120倍、好ましくは約100倍に希釈し、ついで適当な量の修飾ヒトIgM溶

液及び抗ヒトIgM抗体結合固相担体あるいは粒子状担体などを反応させ、次に(1)HAV抽出物又は(2)このHAV抽出物を少なくとも界面活性剤、例えばSDSで処理して得られたHAV抗原と免疫学的に反応させ、得られた反応生成物に化学発光標識抗HAV抗体、例えばアクリジニウム標識抗HAV抗体を免疫学的に反応させ、過酸化水素溶液及び水酸化ナトリウム溶液からなるトリガー試薬と反応させた後検知を行うことを特徴とするHAV抗体の測定法が提供される。

【0038】本発明においては、特異的IgM抗体を測定する公知の免疫学的測定法にそれを利用可能であり、例えば、ウイルス感染、病原性微生物感染などにより生ずる特異抗体測定系に応用できると考えられる。ウイルスとしては、単純ヘルペス、帶状ヘルペス、水痘ウイルス、ムンブス、麻疹、風疹、AIDSウイルス(HIV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)などが挙げられ、病原性微生物などとしては、ボツリヌス菌(Clostridium botulinum)、ウェルシュ菌(Clostridium perfringens)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、例えば、MRSA、赤痢菌(Shigella dysenteriae)、百日咳菌(Bordetella pertussis)、腸炎菌(Salmonella enteritidis)などが挙げられる。

【0039】

【実施例】次に実施例を示して、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこの具体例により限定されるものではなく、その思想に従うかぎり各種の形態で実施できることは理解されるべきである。

【0040】実施例1

修飾IgMの調製

市販のヒトIgM溶液(米国ケミコン・インターナショナル[Chemicon International, U.S.A.]社製)を1mg/mlとなるように、0.9%塩化ナトリウム及び0.1%アジナトナトリウムを含有する10mMトリス(Tris)塩酸緩衝液(pH 8.5)(以下、「ヒトIgM緩衝液」という)中に希釈し、得られたヒトIgM溶液に、ジオオスリートール(DTT)を含有し、0.9%塩化ナトリウム及び0.1%アジナトナトリウムを含有する10mMリン酸緩衝液(pH 8.5)をDTT濃度が2mMになるよう加え、室温で1時間処理した。次にDTT処理ヒトIgM溶液に、ヨード酢酸を含有し、0.9%塩化ナトリウム及び0.1%アジナトナトリウムを含有する10mMトリス(Tris)塩酸緩衝液(pH 8.0)を、DDTに対してヨード酢酸が5倍モル量になるように加え、室温で時間処理した。得られた修飾IgM溶液を、ヒトIgM用緩衝液中で透析し、残存したDTT、ヨード酢酸及びその混合物を十分に取り除いた後、ヒトIgMの濃度で75μg/mlになるようにヒトIgM用緩

衝液で希釈し、4℃で様々な時間保存し、希釈用ヒトIgM試薬として用いた。

【0041】抗ヒト μ -IgM抗体被覆微粒子の調製
ヤギから得られたヒトIgMの μ 鎖に対して特異性をもつポリクローナル抗体(米国ジャクソン・イムノ・リサーチ・ラボ社製【Jackson Immuno Research Labo., USA】)をカルボキシル化ポリスチレンラテックス微粒子(米国セラダイン社製【Seradyn, USA】; 0.2 μm)に以下に記載の方法で結合した。まず、0.015MのMES(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)緩衝液(pH 4.7)中の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC; 1.6 mg/ml)を用いてポリクローナル抗体抗ヒトIgM抗体(1.60 mg/ml)を室温で1.5時間かけて結合した。次に1%ツイーン(Tween 20)及び0.9%NaClを含有する0.05Mのリン酸緩衝液(pH 7.2)を用いて洗浄した。最終的には、0.05%ゼラチン、0.1%ツイーン20、0.9%NaCl及び0.1%アジダントリウムを含有する0.01Mのトリス(Tris)緩衝液(pH 7.4)中に貯蔵した。被覆微粒子の固形分の%が、0.0625%になるように貯蔵パッファーで希釈し、抗ヒト μ -IgM抗体被覆微粒子試薬とした。

【0042】アクリジニウム標識抗HAV抗体の調製
β-アラニンアクリジニウム(1 mg)を無水ジメチルホルムアミド(DMF)(1.00 μl)中に溶解し、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(5.75 mg/ml、5.0 μl)及びEDAC(9.6 mg/ml、5.0 μl)を連続して添加し、暗所、25℃で48時間攪拌することにより活性化した。プロテインA精製モノクローナル抗HAV抗体(1 mg/ml)を含有している、0.9%NaCl及び0.5%CHAPSを含む0.1Mのリン酸緩衝液(pH 8.0)に活性化アクリジニウムを加え(抗体の4倍のモル数)、反応混合物を室温中で10分間懸念した。緩衝液を0.1%CHAPS、0.1%アジダントリウム及び0.9%NaClを含有する0.01Mのリン酸緩衝液(pH 6.3)に置き換えた後、調整物を遠心分離にかけ、上清を置換後のものと同じ緩衝液で平衡化したバイオシリ SEC 250(米国バイオラド社製【Biolog, USA】)のHPLCカラム上のクロマトグラフィーにかけた。それぞれのフラクション(1 ml)を369 nm及び280 nmでの紫外分光分析により分析し、アクリジニウムの結合量を決定した。結合体を濃縮フラクション(約1.00 μg/ml)中、約4℃で貯蔵し、使用前に1%カゼインナトリウム、0.1%ツイーン20、0.1%アジダントリウム、5 mM EDTA及び0.9%NaClを含有する0.05Mのリン酸緩衝液(pH 6.3)で希釈し、アクリジニウム標識抗HAV抗体試薬とし

た。

【0043】HAV抗原の調製

HAVは栄養培地中のバースーアレキサンダー細胞(Barth-Alexander Cells)を用いて培養した。培養細胞に、0.5%トライトン(Triton X-100)を含有しかつ5 mM EDTA及び0.9%NaClを含む0.02Mリン酸緩衝液(pH 7.2)を混合し、36℃で16~68時間攪拌した後、遠心分離にかけ、上清を捨てることにより、HAV抽出物をホルムアルデヒド希釈倍率で1:4000となるように添加した後、36℃で3日間攪拌して、HAVの感染性を不活性化した。不活性化したHAV抽出物は、1%牛血清アルブミン、0.05%ツイーン20、0.1%アジダントリウム、5 mM EDTA及び0.9%NaClを含有する0.01Mのリン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈し、HAV抗原試薬とした。HAV抗原試薬は使用時まで4℃で貯蔵した。

【0044】アッセイ

HAV-M陽性バッパー試料を生理食塩水で希釈した。室温で様々な時間保存した修飾IgM試薬(3.0 μl)を用いて希釈試料をさらに5倍に希釈した。比較としてHAVAB-M陰性バッパー試料を生理食塩水で希釈した後に、IgMを希釈する際に用いた緩衝液を用いてさらに5倍に希釈した。希釈した試料(1.25 μl)を容器に入れ、これに抗ヒト μ -IgM抗体被覆微粒子試薬(3.0 μl)を添加し、37℃で20分間反応させた。反応した微粒子をガラス繊維フィルターで捕捉し、0.1Mのホウ酸緩衝液(pH 8.5)(3.00 μl)で2回洗浄した。次にHAV抗原試薬(3.0 μl)をフィルター表面に添加し、37℃で20分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを0.1Mのホウ酸緩衝液(pH 8.5)(1.00 μl)で1回、そして同緩衝液(3.00 μl)で1回洗浄した。次にアクリジニウム標識抗HAV抗体試薬(3.0 μl)をフィルター表面に添加し、37℃で10分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを0.1Mのホウ酸緩衝液(pH 8.5)(1.00 μl)で1回、そして同緩衝液(3.00 μl)で1回洗浄した。

【0045】このフィルターを化学発光読取り機に移し、この中で0.25 NのNaOH中の0.4%過酸化水素を含む発色浴液(5.0 μl)をフィルターに送り込んだ。微粒子に結合したアクリジニウムが発光し、生じた光の量を測定した。結果を図1に示す。無処理のIgM試薬では、保存時間の経過と共にIgM分子の凝集による発光量(光子カウント)の増加が観察されるが、DTT処理後ヨード酢酸で修飾したIgM試薬では、保存時間の経過によっても発光量(光子カウント)の増加はない。

【0046】実施例2

S D S 处理 H A V 抗原の調製

H A V は栄養培地中のバースーアレキサンダー細胞 (B a r t h - A l e x a n d e r C e l l s) を用いて培養した。培養細胞に、0. 5% ロートライオン (T r i t o n) X - 1 0 0 を含有しかつ 5 m M EDTA 及び 0. 9% Na C l を含む 0. 0 2 M リン酸緩衝液 (p H 7. 2) を混合し、3 6°C で 1 6 ~ 6 8 時間攪拌した後、遠心分離にかけ、上清を捨てることにより、H A V 抽出物をホルムアルデヒド希釈倍率で 1 : 4 0 0 0 となるように添加した後、3 6°C で 3 日間攪拌して、H A V の感染性を不活性化した。不活性化したH A V 抽出物に S D S を添加し、室温で 2 4 時間攪拌して、S D S 处理 H A V 抽出物を得た。S D S は 1. 2 w t %までの各種濃度となるようにして添加した。S D S 处理 H A V 抽出物は、0. 1% のアジナナトリウム、5 m M EDTA 及び 0. 9% Na C l を含む 0. 0 1 M リン酸緩衝液 (p H 7. 2) で希釈して、S D S 处理 H A V 抗原試薬とした。S D S 处理 H A V 抗原試薬は使用時まで 4°C で貯蔵した。

【0 0 4 7】 アッセイ

実施例 1 と同様にして、H A V - M 関性ペネル試料を生理食塩水で希釈した。希釈試料を修飾 I g M 試薬 (3 0 μ l) を用いてさらに 5 倍に希釈した。比較として H A V - M 関性ペネル試料を生理食塩水で希釈した後に、無処理 I g M 試薬を用いてさらに 5 倍に希釈した。希釈した試料 (1 2 5 μ l) を容器に入れ、これに抗ヒト μ - I g M 抗体被覆微粒子試薬 (3 0 μ l) を添加し、3 7°C で 2 0 分間反応させた。反応した微粒子をガラス繊維フィルターで捕捉し、0. 1 M のホウ酸緩衝液 (p H 8. 5) (3 0 0 μ l) で 2 回洗浄した。次に S D S 处理 H A V 抗原試薬 (3 0 μ l) をフィルター表面に添加し、3 7°C で 2 0 分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを 0. 1 M のホウ酸緩衝液 (p H 8. 5) (1 0 0 μ l) で 1 回、そして同緩衝液 (3 0 0 μ l) で 1 回洗浄した。次にアクリジニウム標識抗 H A V 抗体試薬 (3 0 μ l) をフィルター表面に添加し、3 7°C で 1 0 分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを 0. 1 M のホウ酸緩衝液 (p H 8. 5) (1 0 0 μ l) で 1 回、そして同緩衝液 (3 0 0 μ l) で 1 回洗浄した。

【0 0 4 9】 このフィルターを化学発光読取り機に移し、この中で 0. 2 5 N の Na O H 中の 0. 4% 過酸化水素を含む発光溶液 (5 0 μ l) をフィルターに送り込んだ。微粒子に結合したアクリジニウムが発光し、生じた光の量を測定した。得られた結果を図 2 に示す。図 2 に示す結果は試料を希釈するために添加された無修飾 I g M 試薬及び修飾 I g M 試薬で希釈したときの試料中の濃度で、7. 5 μ g / リットルの I g M を 1 とした。図 2 より修飾ヒト I g M 含有液で希釈することにより、より少量の I g M 含有液の使用で効果が得られることが判明した。こうした測定系において、修飾 I g M 試薬は保存性、利便性、そして 5 倍体のままの I g M を添加する場合に比べて優れた希釈効果が得られることがわかる。免疫学的測定における試薬として、このように優れた性状を示すことは予想外のことである。

【0 0 5 0】

【発明の効果】 試料中の I g M 抗体の測定において、希釈液量の制限を回避し、必要な測定範囲を得ると共により優れた測定を行なうため、被検試料を少なくとも修飾 I g M または修飾 I g M 含有水溶液により希釈することで、安定した、さらに自動化された広範囲の測定系を組み立てることが可能となった。修飾 I g M または修飾 I g M 含有水溶液は、保存安定性に優れ、簡便に利用でき、さらに非修飾 I g M よりも大きな効果をもたらす。より早い時期（急性期）で特異的な I g M、例えば、H A V 関連抗体を検出したり、前希釈の希釈倍率を低減せしめてより広範囲の測定を可能にし、例えば、A 型肝疾患などの診断・検出を確実に行なうことが可能になる。修飾 I g M は分子量が低下しているため、沈殿・凝集を起こしにくい。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 種々の時間保存した後の修飾 I g M 希釈液で希釈された場合と非修飾 I g M 希釈液で希釈された場合との免疫測定での発光量における関係を示す。

【0 0 4 8】 実施例 3

実施例 1 と同様にして、H A V - M 関性ペネル試料を生理食塩水で希釈した。希釈試料を種々の濃度に修飾 I g M 試薬を用いてさらに希釈した。比較として H A V - M 関性ペネル試料を生理食塩水で希釈した後に、無修飾 I

【図2】 修飾 IgM量及び非修飾 IgMの添加量と試料希釈必要量との関係を示す。

【図1】

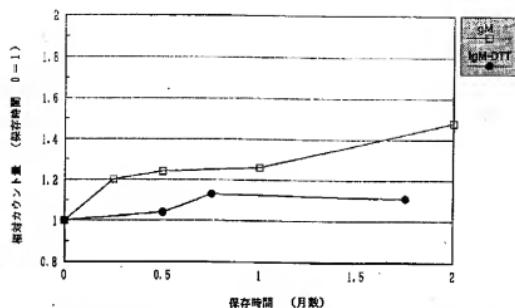


図1 免疫測定における非修飾IgM (IgM) 及び修飾IgM (IgM-DTT) の安定性

【図2】

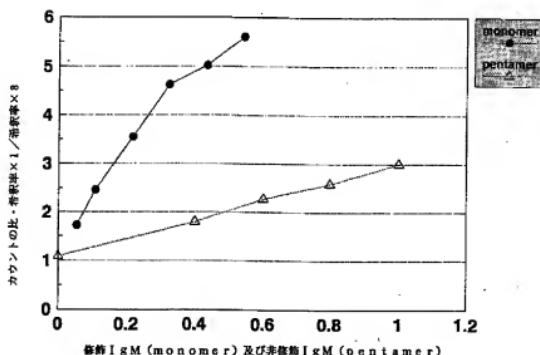


図2 免疫測定における添加IgMの量とその及ぼす効果との関係